



脂质过氧化物(LPO)测试盒说明书(精简版)

(货号:A106-1)

免责声明: 测试前请仔细阅读说明书,预试后再进行批量实验,否则由此导致的后果用户自行承担!

一、试剂组成及配制:(试剂盒有效期1年)

试剂	组分	20T/18样 (A106-1-1)	50T/48样 (A106-1-2)	100T/96样 (A106-1-3)	保存
试剂一	基质贮备液	15mL×1瓶	30mL×1瓶	60mL×1瓶	2~8℃
	基质稀释液	5mL×1瓶	10mL×1瓶	20mL×1瓶	2~8℃
试剂一应用液配制:将贮备液和稀释液按3:1体积比混合现用现配					
试剂二	显色剂	5mL×1瓶	10mL×1瓶	18mL×1瓶	2~8℃
试剂三	10μmol/L标准液	5mL×1瓶	5mL×1瓶	5mL×1瓶	2~8℃

二、测定原理:

脂质过氧化物(LPO)在45℃反应60分钟条件下,一分子脂质过氧化物(LPO),和两分子的显色试剂反应,产生一种稳定的生色团,在586nm下有最大吸收峰。通过作标准曲线对照,或通过公式计算可得到检测物中脂质过氧化物(LPO)的含量。

三、测定意义:

在动植物体内,很多脂类含有不饱和脂肪酸,特别在生物膜的磷脂中,不饱和脂肪酸含量极高。不饱和脂肪酸化学性质很不稳定,很容易受到过氧化作用导致损伤,产生有细胞毒性的脂质过氧化物。近年来研究证明,脂质过氧化化合物能破坏人体细胞正常生理功能与某些疾病的病理过程,如肿瘤、化学中毒、感染、炎症、自身免疫疾病、动脉粥样硬化(AS)及心脑血管疾病,以及衰老等生理过程均有密切联系。

脂质过氧化被证实是一种细胞损伤机理,作为细胞和组织中氧化应激的一种指标。脂质过氧化物是不稳定的,其可分解形成一系列复杂的混合物,包括反应的羰基混合物。多不饱和的脂肪酸过氧化物分解产生丙二醛 Malondialdehyde(MDA)和4-羟基烯酮类(HAE)。LPO、MDA和HAE的测量已经被用作脂质过氧化的一种指标。

四、所需仪器耗材及试剂:

含586nm波长的酶标仪及96孔板、45℃水浴锅或恒温箱、沸水浴锅、台式低速离心机、各种规格移液器、蒸馏水、涡旋混匀器、试管或离心管、蛋白测定试剂(本公司有售)。

五、操作步骤:

1、样本前处理:

血清(浆)样本: 直接取样进行操作;

组织样本: 准确称取组织重量,按重量(g):体积(mL)=1:9的比例加入生理盐水,冰水浴匀浆,2500转/分,离心10分钟,取上清液检测。

细胞样本: (贴壁细胞)用细胞刮配合等渗PBS刮下或用胰酶消化下来(消化后加入0.5-1mL等渗PBS冲洗),再将细胞悬液转移到另一离心管中,1000转/分,离心10分钟,弃上清液,留细胞沉淀;用等渗缓冲液(推荐0.1mol/L、pH7~7.4磷酸盐缓冲液)清洗1~2次,同样1000转/分,离心10分钟,弃上清液,留细胞沉淀(若不立即测定,可直接放-20℃或-80℃冰箱保存,3个月内可用);往细胞沉淀中加入0.2~0.3mL的匀浆介质(推荐0.1mol/L pH7~7.4的PBS或生理盐水)(加完匀浆介质后轻轻混匀细胞溶液,使其均匀,吸取少量进行细胞计数;若是破碎后可以测蛋白,则不用细胞计数),冰水浴条件下超声破碎(功率:300W,3~5秒/次,间隔30秒,重复3~5次)或手动匀浆,制备好的匀

浆液若比较均匀可不离心直接测定。也可采用裂解液裂解(推荐TritonX-100,1~2%,浓度0.1-0.2mL裂解30~40分钟),裂解好的液体可不离心直接测定。[注]:建议细胞数在100万个以上(越多测定效果越好)。破碎好的液体可显微镜观察细胞是否破碎完全。

2、操作表:

取所需数量的1.5mL的带盖的离心管(本所有供应),编号号后,按下表进行操作。

	空白管	标准管	测定管
无水乙醇(μL)	200		
10μmol/L标准品(μL)		200	
样本(μL)			200
试剂一应用液(μL)	650	650	650
盖上盖充分混匀			
试剂二(μL)	150	150	150
盖上盖,涡旋混匀,45℃孵育60分钟,4000转/分,离心10分钟,取上清液200μL加入到96孔板中,586nm波长,酶标仪测定各孔吸光值A			

操作注意点: 操作时请戴手套及注意防止试剂溅入眼及皮肤上。

六、计算公式:

血清样本计算公式:

$$\text{血清(浆)中LPO含量}(\mu\text{mol/L}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}}$$

组织样本计算公式:

$$\text{组织中LPO含量}(\mu\text{mol/gprot}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

细胞样本计算公式:

$$\text{细胞中LPO含量}(\mu\text{mol}/10^4\text{个细胞}) = \frac{A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}}{A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div \frac{\text{细胞数}}{V}$$

C_{标准}: 标准液浓度,10μmol/L;

C_{pr}: 匀浆液蛋白浓度,gprot/L (prot指蛋白);

细胞数: 细胞破碎时的细胞总数,万个;

V: 细胞破碎时加入的匀浆介质的总体积,L。

注: 细胞样本计算时,也可以用组织样本的计算公式。

七、注意事项:

- 1、处理样本和试剂时请带上一一次性手套;
- 2、如果R1试剂或者R2试剂不慎沾到皮肤上,粘膜上或者眼睛里,用清水充分的清洗沾到试剂的部位;
- 3、反应完离心后,如上清浑浊,可加大离心转速后再离心;
- 4、本试剂盒仅用于科研,不能用于临床诊断;

附录 I : LPO 标准曲线的制备

1、前处理:

用无水乙醇将10μmol/L标准品稀释成不同浓度的标准液:

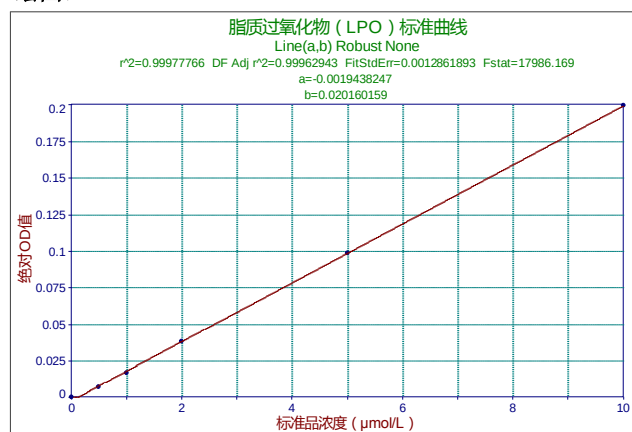
5μmol/L、2.5μmol/L、1μmol/L、0.5μmol/L、0μmol/L。

2、操作表:

	空白管	标准管
无水乙醇(μL)	200	
不同浓度的标准液(μL)		200
试剂一应用液(μL)	650	650
盖上盖充分混匀		
试剂二(μL)	150	150
盖上盖,涡旋混匀,45℃孵育60分钟,取上清液200μL加入到96孔板中,586nm波长,测定各孔吸光值A		



3、绘图：



（标准曲线用户可以不画，直接按操作表操作，按计算公式计算即可，结果不受影响）